

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-145797

(P2002-145797A)

(43)公開日 平成14年5月22日(2002.5.22)

(51)Int.Cl.⁷
A 6 1 K 38/00
47/26
47/36
47/42
A 6 1 P 9/10

識別記号

F I
A 6 1 K 47/26
47/36
47/42
A 6 1 P 9/10
A 6 1 K 37/02

テマコード^{*}(参考)
4 C 0 7 6
4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数 5 OL (全 5 頁)

(21)出願番号 特願2000-342856(P2000-342856)

(22)出願日 平成12年11月10日(2000.11.10)

(71)出願人 500348664
米田 正始
京都府京都市上京区室町通権木町下ル大門
町256 御所西アーバンライフ303

(71)出願人 599029420
田畠 泰彦
京都府宇治市琵琶台3-8-16

(71)出願人 000124269
科研製薬株式会社
東京都文京区本駒込2丁目28番8号

(72)発明者 米田 正始
京都府京都市上京区室町通権木町下ル大門
町256

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒドロゲルからなる細胞移植療法用材料

(57)【要約】

【課題】心不全治療における細胞移植療法に適用できる、早期に移植細胞の生着率を向上させ、移植細胞の分化・増殖を促進し、心機能改善をはかることのできる細胞移植療法用材料を提供する。

【解決手段】細胞増殖因子を含有するヒドロゲルからなる細胞移植療法用材料。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞増殖因子を含有するヒドロゲルからなる細胞移植療法用材料。

【請求項2】 細胞増殖因子が、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子- β （TGF- β ）、血管内皮細胞成長因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）からなる群より選ばれた少なくとも1種類である請求項1に記載の材料。

【請求項3】 細胞増殖因子が、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）である請求項2に記載の材料。

【請求項4】 ヒドロゲルが、ゼラチン、コラーゲン、デンプン、ベクチン、ヒアルロン酸、キチン、キトサンまたはアルギン酸及びこれらの材料の誘導体からなる群より選ばれた少なくとも1種類である請求項1～3のいずれか一項に記載の材料。

【請求項5】 ヒドロゲルが、架橋ゼラチングルである請求項1～4のいずれか一項に記載の材料。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、虚血性心筋症による心不全の治療における心筋内への細胞移植療法のための、細胞増殖因子を含有するヒドロゲルからなる細胞移植療法用材料に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、心臓疾患領域においてターミナルステージとも言うべき心不全状態を呈する症例が増加している。これらの症例に対し内科的にも外科的にもその治療法は進歩してきた。しかし、現時点では未だ決定的な治療法は存在しない。1999年より本邦でも心臓移植が再開されたが、今後定着した治療法とはなり難い。移植先進国の欧米では心臓移植はすでに定着した治療法となり、優れた成績を残しているが、遠隔期においては移植心の冠動脈病変の進行、慢性期の拒絶反応などの問題もあり完全ではない。そして何よりもドナー不足が最大の問題であり、北米では需要のわずか10-15%の供給しか間に合っていないのが現状である。こうした中、心臓移植に代わる新たな治療法の確立が切望されている。

【0003】 そこで、心臓移植に代って他の方法で障害心筋を新たに正常な心筋細胞で置換したり、或いは残存する正常心筋細胞を増殖させるというアイデアが提唱された。これが成功するならば障害心筋を再生あるいは置換し、心機能を改善させ、心臓を再生させることが可能となる。最近、心筋梗塞動物モデルを用いた細胞移植療法の有効性が報告されている。しかし、慢性虚血部位へ細胞を移植することは若干の血管新生能は期待できるものの、通常、細胞には十分な酸素と栄養が必要であり、これらは主に血管を経由して運搬されるので、心筋梗塞部のように血流が乏しい部位ではこれらの供給が不十分

で細胞生着率が低下し、その効果が半減すると考えられた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、これらの問題点を解決するために、心不全治療における細胞移植療法に適用できる生体適合性に優れ、かつ、早期に移植細胞の生着率を向上させ、移植細胞の分化・増殖を促進し、心機能改善をはかることのできる細胞移植療法用材料を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】かかる現状において、本発明者らは上記課題を解決するためには、心筋梗塞部への細胞移植に先立ち、細胞増殖因子を心筋梗塞内で徐放化させ、あらかじめ血管新生を促進させた後、細胞移植を施行することが必要であると考えた。本発明者らはこれを現実化するべく鋭意研究をおこなった結果、細胞増殖因子を含有した生体吸収性のヒドロゲルが細胞移植療法用材料として有用であることを見出し本発明を完成させた。すなわち本発明は、細胞増殖因子を含有するヒドロゲルからなる細胞移植療法用材料を提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の細胞移植療法用材料は、生体適合性の良いヒドロゲルに細胞増殖因子を含有させたものである。

【0007】 本発明に適用される細胞増殖因子としては、塩基性線維芽細胞成長因子（以下、bFGFといふ）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子- β （TGF- β ）、血管内皮細胞成長因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）など一般に細胞増殖（成長）因子と呼ばれているもの、あるいは心筋細胞または血管内皮細胞、平滑筋細胞など血管を構成する細胞を増殖させる活性を有する物質、例えば、インターロイキン、サイトカイン、生理活性ペプチド類などがあげられる。特に好ましくは、bFGFがあげられる。

【0008】 本発明に使用できるbFGFは、天然より単離されたもの、組換えDNA技術等の遺伝子工学的手法で製造されたもの、更に、これらの修飾体であってbFGFとしての活性を有するものを含む。bFGFの修飾体としてはbFGFのアミノ酸配列においてアミノ酸が付加、置換または欠失したものをあげができる。本発明に使用できるbFGFとしては、好ましくは、例えば、WO87/01728、WO89/04832に記載されたものがあげられる。

【0009】 本発明の細胞移植療法用材料における細胞増殖因子の量は、疾患の程度、患者の状態等によって適宜選択しうるが、例えば投与部位あたり0.1 μg ～10mgである。

【0010】 細胞増殖因子を含有させるヒドロゲルとしては、生体吸収性を持つヒドロゲルであれば特に制限は

ないが、例えば、ゼラチン、コラーゲン、デンプン、ベクチン、ヒアルロン酸、キチン、キトサンまたはアルギン酸及びこれらの材料の誘導体など、好ましくはゼラチンからのヒドロゲルがあげられる。ヒドロゲルは、上記した各種ヒドロゲル材料を化学架橋してまたはゲル化剤、例えば金属塩、無機塩類などで処理して得てもよい。本発明で用いるゼラチンは、特に制限ではなく、通常入手できるものでよい。例えば、等電点4.9のアルカリ処理ゼラチン、等電点9.0の酸処理ゼラチン等があげられる。本発明のヒドロゲルとしては、ゼラチンを化学架橋処理して得られる架橋ゼラチンヒドロゲルが特に好ましい。ゼラチンの化学架橋法としては公知の方法を利用することができる。例えば、ゼラチンの架橋剤としては、生体に対して毒性のないものであればよく、グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩などがあげられる。また、ゼラチンを熱処理または紫外線照射によって架橋してヒドロゲルを得てもよい。

【0011】本発明で用いるヒドロゲルの形状は、細胞移植部位またはその近傍に導入できれば特に制限はないが、例えば球状、粒子状、ペースト状、シート状、ディスク状、円柱状、角柱状などがあげられる。本発明におけるヒドロゲルの含水率は約50～99W/W%、好ましくは85～99W/W%、特に好ましくは92～97W/W%である。上記したヒドロゲルは、例えばWO94/27630に記載の調製法により製造することができる。

【0012】本発明の細胞移植療法用材料は、用いるヒドロゲルの性質、特にヒドロゲルを作製するための材料の性質、ヒドロゲル材料の架橋の程度、ヒドロゲルの含水率により、活性成分である細胞増殖因子の放出速度を変化させることができる。この細胞増殖因子の放出速度またはヒドロゲル自体の分解吸収速度は、自己細胞の増殖による生体組織の形成または新生を左右する重要な因子である。本発明では、これらの因子、すなわち細胞増殖因子の徐放とヒドロゲルの分解をうまくコントロールでき、投与に最適な細胞移植療法用材料を設計することができる。

【0013】本発明の細胞移植療法用材料は、心不全治療における細胞移植療法として心筋内への細胞移植、特に、虚血性的心室壁内へ細胞を移植する際に用いることができる。細胞移植の部位としては、左心室、右心室または心房などがあげられる。細胞移植に用いられる細胞としては、心筋細胞、骨髄間質由来の幹細胞、胚性幹細胞(ES細胞)、始原生殖細胞(EG細胞)、線維芽細胞、骨格筋由来の筋芽細胞や衛星細胞、平滑筋細胞またはこれらの細胞に由来する細胞があげられる。

【0014】本発明の細胞移植療法用材料は、細胞移植の7～10日前に投与することにより細胞移植の治療効果を増強することができる。また、細胞移植と同時ない

し後から投与してもよい。投与方法は、手術時あるいは経カテーテル的に直接心筋内に注入するか、手術を行い細胞移植部位またはその周辺に置いて使用することもできる。細胞移植療法用材料の使用量は適用部位の大きさや形状等によって適宜選択され得る。

【0015】

【実施例】以下、実施例をあげて本発明について説明をするが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0016】実施例1(ヒドロゲルの製造)

bFGFを含有するゼラチンヒドロゲルは、WO94/27630に記載の方法により調製した。具体的には、等電点が4.9のアルカリ処理ゼラチン水溶液(10wt%, 20ml)とオリーブオイル(5ml)の混合物を40℃で予熱し、1分間攪拌し、調製したエマルジョンを氷冷下で天然ゼラチンを除いた後、アセトンを加え、さらに1時間4℃で攪拌した。得られたゼラチン粒子をアセトン(4℃)で3回洗浄し遠心分離(5000rpm, 4℃, 5分間)により回収した。得られた未架橋ゼラチン粒子(20mg)を、グルタルアルデヒド(0.13wt%)を含むTween80の水溶液(0.1wt%, 20ml)に懸濁させ、4℃、24時間攪拌することによって架橋反応を行った。遠心分離(5000rpm, 4℃, 5分間)により回収した後、グリシン水溶液(20ml, 10mM)中、37℃で1時間攪拌し、蒸留水で3回洗浄した後、凍結乾燥した。得られた架橋ゼラチン粒子の平均粒径は10μmであった。また、含水率は95W/W%であった。bFGFはWO87/01728のFig.4に記載のヒトbFGFを用い、2mgの凍結乾燥ゼラチン粒子にbFGF水溶液(5mg/ml, 20μl)を滴下し、室温で1時間放置することによって架橋ゼラチン粒子内に含浸させた。

【0017】実施例2(虚血性心筋症モデルにおける評価)

10週令同種同系ルイスラットを全身麻酔下に左前下行枝を結紮し、虚血性心筋症ラットを作製した(n=43)。初回手術から4週間後に心エコーにて心筋梗塞サイズ及び心機能を測定し、これら虚血性心筋症ラットを無作為に4群に分け、次の如く処置をした。培養液のみを注入したものをコントロール群(Control群:n=11)、胎児心筋細胞6×10⁶個を梗塞巣中央に注入したものを細胞移植群(TX群:n=11)、実施例1で得たbFGF100μgを直径10μmの架橋ゼラチン粒子に含侵させたものを心筋梗塞部に注入したものをFGF群(FGF群:n=11)、実施例1で得たbFGF-架橋ゼラチン粒子を注入し、1週間後に細胞移植を施行したものをFGF+細胞移植群(FGF-TX群:n=10)とし、さらに4週後に心エコー及びミラーカテーテルを用いてin vivoにおける心機能を評価した。処置前の結果を表1-1に、処置後の結果を表1-2に示す。

【表1】

表1-1(処置前)

	Control (n=11)	TX (n=11)	FGF (n=11)	FGF-TX (n=11)	P Value
LVDd (mm)	10.3 ± 0.8	10.1 ± 0.7	9.7 ± 0.9	9.7 ± 0.9	0.33
LVDs (mm)	7.9 ± 2.2	7.8 ± 0.9	7.9 ± 1.1	7.8 ± 1.0	0.10
FS (%)	18.8 ± 5.4	22.4 ± 5.4	19.1 ± 6.7	19.8 ± 4.1	0.41
HR (bpm)	373 ± 32	364 ± 31	359 ± 47	372 ± 43	0.81
Infarction size(%)	27.4 ± 2.9	27.0 ± 4.1	30.8 ± 5.3	29.3 ± 4.0	0.13

All data are shown as means ± SD.

表1-2(処置後4週間)

	Control (n=11)	TX (n=11)	FGF (n=11)	FGF-TX (n=11)	P Value
LVDd (mm)	10.7 ± 0.6	10.0 ± 1.1	9.5 ± 0.7	9.6 ± 0.6	0.0057
LVDs (mm)	8.8 ± 0.7	7.2 ± 0.9	7.2 ± 1.1	7.0 ± 1.0	0.0001
FS (%)	17.3 ± 4.6	28.4 ± 4.4	24.5 ± 8.6	27.4 ± 7.3	0.0012
HR (bpm)	357 ± 31	374 ± 36	363 ± 40	378 ± 56	0.67
Infarction size(%)	27.5 ± 3.5	27.0 ± 4.6	28.1 ± 5.2	24.9 ± 5.0	0.13

All data are shown as means ± SD.

表中、LVDdは左室拡張末期径、LVDsは左室収縮末期径、FSは左室（短軸）縮小率、HRは心拍数、Infarction sizeは心筋梗塞の割合を表す。

【0018】処置前（初回手術4週間後）では、4群間にて心機能上有意差は認められず、LVDd、LVDsともに拡大し、FSは有意に低下し、虚血性心筋症による心不全の状態を示した。処置後4週間ではLVDdにおいてはFGF群、FGF-TX群でControl群に比べ有意に小さく、TX群、FGF群、FGF-TX群ではLVDs、FS、及びグローバルな左室収縮能の指標となるLVEmaxにおいてControl群に比べ有意に心収縮能の改善を認めた。更に、FGF-TX群ではTX群、FGF群と比較して、LVEmaxにおいて有意な改善を認めた。また、拡張機能の指標となる左室拡張末期圧（LVEDP）においても他群に比し低値を示す傾向を認めた。LVEmax及びLVEDPの結果を図1に示す。

【0019】以上より、胎児心筋細胞を慢性虚血性心筋

症ラットに移植することで、左室収縮機能の改善が認められるものの、本発明のbFGFを含有した細胞移植療法用材料を前投与し、あらかじめ血管新生（prevascularization）させることで、より一層移植細胞の生着を高め、細胞移植の効果を増強することが明らかとなった。また、bFGFは移植胎児心筋細胞に作用し、その分化・増殖に関与している可能性も示唆された。

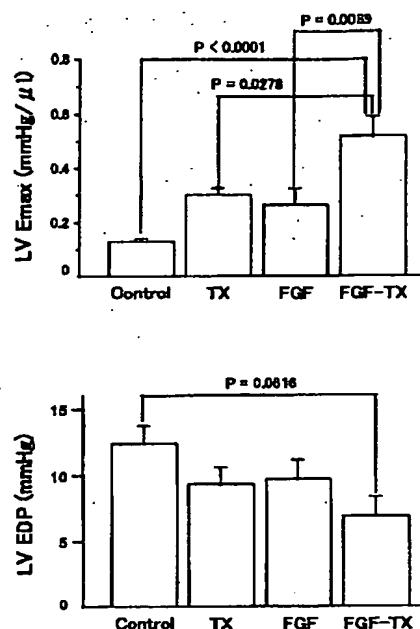
【0020】

【発明の効果】本発明の細胞移植療法用材料は、生体適合性に優れ、早期に移植細胞の生着率を向上させ、心機能改善を図ることのできる細胞移植療法の効果を増強させる材料として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2において処置後4週間の各処置群のLVEmax及びLVEDPの値を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 田畠 泰彦

京都府宇治市琵琶台3-8-16

Fターム(参考) 4C076 AA09 CC11 CC50 DD40 EE36

EE37 EE38 EE42 EE43 EE45

EE53

4C084 AA02 AA03 DB54 DB55 DB62

MA05 NA05 NA13 ZA362